有机介质中脂肪酶催化 *N*-丙基曲克芦丁酰胺类似物的合成研究王宏雁 杨亮茹 肖咏梅* 毛璞 朱晓亮
袁金伟 屈凌波

(河南工业大学化学化工学院 郑州 450001)

摘要 在非水介质中, 脂肪酶选择性催化曲克芦丁乙烯酯与脂肪胺进行酰胺化反应, 合成系列 *N*-丙基曲克芦丁酰胺类似物. 考察了酶源、酶量、反应介质、溶剂含水量、反应时间等因素对曲克芦丁乙烯酯的酰胺化区域选择性的影响. 结果表明: 反应温度 50 °C, 以吡啶为溶剂、且其含水量小于 1% 时, lipase LS-10 催化活性最高; 当酶用量 20 mg/mL, 反应时间 21 h 后, 反应基本达到平衡.

关键词 酰胺化; 曲克芦丁; 酶促合成; 脂肪胺; 区域选择性

Synthesis of Novel Fatty Amide Analogues of Troxerutin Catalyzed by Lipase in Organic Medium

Wang, Hongyan Yang, Liangru Xiao, Yongmei* Mao, Pu Zhu, Xiaoliang
Yuan, Jinwei Qu, Lingbo

(College of Chemistry & Chemical engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001)

Abstract In nonaqueous medium, a series of troxerutin amidation analogues were synthesized by the reaction of vinyl-troxerutin esters with fatty amines. The influence parameters including enzyme source, the amount of the enzyme, reactive medium, water content of solvents and reaction time were investigated. The results showed that the amidation occurred regioselectively at vinyl-ester bond. Using pyridine as solvent (water content <1%), the amidation reaction catalyzed by lipase LS-10 (20 mg/mL) reached plateau after 21 h at 50 °C.

Keywords amidation; troxerutin; enzymatic synthesis; fatty amine; regioselectivity

黄酮类化合物作为多酚基化合物, 具有抗氧化、抗过敏、抗癌、抗肿瘤等多种生物活性^[1]. 为了进一步增加黄酮类化合物的应用范围, 以黄酮类化合物为先导化合物对其修饰和改性, 特别是将含氮结构引入黄酮类化合物, 以期改善其溶解性和生理、药理活性, 成为近年来研究热点. 研究发现, 在黄酮和异黄酮化合物上引入含氮官能团后, 它们对人类子宫颈上皮癌、肝癌等常见的癌细胞具有抗增殖活性^[2]. Babu^[3]和 Li 等^[4]利用二溴烷烃先与白杨素 7-OH 发生亲电取代反应, 引入可反应的活性基团, 然后与吗啡啉、哌嗪类化合物、*N,N*-二甲基胺进行氨解反应, 合成新型白杨素的含氮衍生物. 此衍生物相比于母体白杨素而言, 其活性具有明显提高. Shin 等^[5]通过白杨素与酸发生酯化反应, 得到的白杨素

酯基衍生物显示了良好的控制血糖的作用. Biasutto 等^[6]以槲皮素为底物与含氨基的酸进行酯化反应合成槲皮素酯基衍生物, 提高了化合物稳定性和在 HBSS(平衡盐溶液)溶液中的溶解性, 以及单细胞渗透性能等. 通过 Mannich 反应, 孙逊等^[7]在天然产物黄芩苷元的 C-8 位引入含氮基团, 合成的黄芩苷元衍生物对蛋白激酶有较弱的抵抗活性. Babu 等^[8]用甲醛和一级、二级胺与木蝴蝶素进行 Mannich 反应, 合成了一系列的 8-位胺甲基衍生物, 其活性比木蝴蝶素有显著地提高. 当将含 N 原子的官能团引入到 2'-羟基查耳酮的骨架上, 药理筛选显示其含氮衍生物具有强效 CDK1/cyclin B 抑制活性^[9]. Zhang 等^[10]研究了黄芩甙元、槲皮素及查尔酮衍生物的含氮衍生物, 也发现这些含氮衍生物对 CDKs 显示出增

* E-mail: henangongda@yahoo.com

Received July 15, 2013; revised September 25, 2013; published online October 25, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21172055).

国家自然科学基金(No. 21172055)资助项目.

强的抑制活性。

在黄酮类化合物改性中,常用的方法有生物催化^[11,12]和化学催化^[13,14]。相比于化学方法修饰,酶催化改性的方法具有反应条件温和、选择性高、操作简单等特点,特别是对于多官能团的黄酮类天然产物改性而言,酶催化因具有高的区域选择性和立体选择性而具有明显优势^[15]。Roh 等^[16]在改善大豆苷元的抗癌活性时发现,利用从枯草芽孢杆菌中得到的 CHY107H1 作用于大豆苷元的直接羟基化时,可得到大豆苷元衍生物 7,4',3'-三羟基大豆苷元;当用 *Streptomyces avermitilis* MA-4680 为催化剂^[17],催化大豆苷元和染料木素 3'-位发生羟基化时,它表现出很高的邻二羟基活性,分别得到 3',4',7-三羟基异黄酮和 3',4',5,7-四羟基异黄酮。Mellou 等^[18]报道了以脂肪酶 B 作为催化剂催化黄酮苷与单或多聚脂肪酸的酯化反应,最高产率达到了 85%。Saleem^[19], Nakajima^[20], Ziaullah 等^[21]以异槲皮苷为原料,用 Novozym 435 酶催化,选择性地对糖苷 C-6"羟基进行酯化,合成了异槲皮苷酯基衍生物。酯化后的衍生物不仅溶解性有所提高,而且提高了它们的稳定性和抗氧化活性。

曲克芦丁作为一种重要的黄酮类化合物,具有抗毒、抗过敏、清除自由基、治疗静脉曲张等多种生理活性,选择性地合成曲克芦丁类似物对新药的开发将具有一定的价值。通过酶催化的酰胺化反应、将含氮结构引入黄酮类化合物的工作,尚未见报道。本文在前期合成

曲克芦丁乙烯酯的工作基础上^[22],将具有反应活性的乙烯酯与胺反应,得到系列具有区域选择性的曲克芦丁含氮类似物,同时考察不同反应因素对酶催化酰胺化的影响。

1 结果与讨论

1.1 N-丙胺曲克芦丁酰胺类似物的结构分析

在曲克芦丁乙烯酯中,含有两个酯基,当与脂肪胺(正丙胺、异丙胺)反应时,除原料点外,通过 TLC 和 HPLC 检测都只有一个反应产物。其中一个羰基与 $\text{OCH}_2=\text{CH}_2$ 连接,反应的副产物为乙醛,容易从反应体系逸出,利于酰胺化反应的进行。本文以化合物 **2ag** 为例,从 IR 图谱中看出, 1738 cm^{-1} ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$)吸收峰明显减小,而 1653 cm^{-1} ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$)的吸收峰增大,初步可以判断,其中的一个酯基发生反应,目标化合物中含有酰胺键;在 MS 图谱中, m/z 920.5 对应的是 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子离子峰,可确定目标化合物是酰胺化的产物。在 ^1H NMR 图谱中,曲克芦丁乙烯酯的($\text{OCH}=\text{CH}_2$)在 δ 7.24, 4.88, 4.65 的特征吸收峰消失的同时^[22],在 δ 2.98, 1.40, 0.82 附近出现了正丙基($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)特征吸收峰,说明正丙基进入到产物的结构中;在 ^{13}C NMR 图谱中,与底物曲克芦丁乙烯酯相比,出现了正丙胺(δ 40.5, 22.8, 11.8)的特征吸收峰。其它化合物的数据分析也都证明合成了目标产物 **2af**~**2ef** 和 **2bg**~**2eg**(表 1, Eq. 1)。

表 1 N-正/异丙胺曲克芦丁酰胺类似物的 ^{13}C NMR 化学位移(DMSO- d_6 , δ)
Table 1 Chemical shifts (DMSO- d_6 , δ) of ^{13}C NMR troxerutin amidation analogues

Carbon	2af	2bf	2cf	2df	2ef	2ag	2bg	2cg	2dg	2eg
C-4	177.6	177.8	177.9	177.9	178.0	177.9	177.9	177.9	177.9	177.9
C-7	165.1	165.1	165.1	165.0	165.1	165.1	165.1	165.1	165.1	165.1
C-9	161.2	161.3	161.3	161.2	161.3	161.3	161.3	161.3	161.3	161.3
C-5	157.0	157.0	156.9	157.0	156.9	157.0	157.0	156.9	156.9	156.9
C-2	156.8	156.4	156.5	156.9	156.5	157.0	156.5	156.9	156.8	156.9
C-4'	151.3	151.4	151.5	151.5	151.5	151.5	151.5	151.4	151.5	151.5
C-3'	148.0	147.5	148.1	147.5	147.5	148.1	148.1	147.4	148.1	148.1
C-3	134.2	134.3	134.2	134.3	134.3	134.2	134.2	134.2	134.3	134.3
C-1'	123.4	123.7	123.7	123.7	123.4	123.7	123.7	123.6	123.7	123.7
C-6'	122.8	122.9	122.9	122.9	122.9	122.9	122.9	122.8	122.9	122.9
C-5'	115.4	115.4	115.5	115.5	115.2	115.4	115.4	115.3	115.5	115.5
C-2'	113.6	113.6	113.5	113.6	113.5	113.6	113.6	113.6	113.5	113.5
C-10	105.4	105.6	105.5	105.5	105.5	105.6	105.6	105.5	105.6	105.6
C-1"	101.7	101.9	101.9	101.9	101.9	101.8	101.9	101.9	101.9	101.9
C-1'''	101.3	101.3	101.3	101.3	101.3	101.3	101.4	101.4	101.3	101.3
C-6	98.9	99.0	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.8	98.9	98.9
C-8	93.1	93.3	93.3	93.4	93.4	93.4	93.4	93.2	93.3	93.4
C-3"	76.8	76.9	76.8	76.9	76.9	76.9	76.9	76.8	76.9	76.9
C-5"	76.3	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4
C-2"	74.6	74.6	74.6	74.6	74.6	74.6	74.6	74.6	74.6	74.6
C-4'''	72.2	72.2	72.2	72.2	72.2	72.2	72.2	72.2	72.2	72.2

续表

Carbon	2af	2bf	2cf	2df	2ef	2ag	2bg	2cg	2dg	2eg
C-3'''	70.9	71.1	71.0	71.1	71.0	71.1	71.1	71.1	71.1	71.1
C-2'''	70.6	70.8	71.0	71.0	71.0	71.0	70.9	71.0	70.8	70.9
C-4''	70.7	70.8	70.6	70.7	70.8	70.8	70.8	70.9	70.6	70.8
C-A ₁ (A ₂)	70.7	70.6	70.8	70.8	70.6	70.7	70.8	70.8	70.8	70.8
C-A ₁ (A ₂)	67.6	67.4	67.5	67.3	67.5	67.3	67.6	67.3	67.5	67.5
C-A ₃	70.6	70.6	70.8	70.8	70.8	70.6	70.6	70.6	70.6	70.6
C-5'''	68.7	68.7	68.7	68.7	68.7	68.7	68.7	68.7	68.7	68.7
C-6''	67.3	67.3	67.3	67.5	67.3	67.3	67.3	67.3	67.3	67.3
C-B ₁ (B ₂)	59.9	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0
C-B ₁ (B ₂)	62.8	62.8	62.8	62.8	62.8	62.8	62.8	62.8	62.8	62.8
C-B ₃	59.7	59.8	60.0	59.8	59.8	59.8	59.8	59.7	59.8	59.8
C-6'''	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.1	18.1	18.2
C=O	173.2	173.3	173.4	173.4	173.4	173.1	173.3	173.5	173.4	173.4
	171.0	171.4	171.6	171.6	171.6	171.8	172.2	172.6	172.5	172.4
Amine	40.6	40.5	40.6	40.6	40.6	40.5	40.6	40.5	40.4	40.6
	22.9	22.9	22.9	22.9	22.9	22.8	22.9	22.8	22.9	22.9
	22.6	22.6	22.5	22.6	22.5	11.8	11.9	11.8	11.8	11.8
(CH ₂) _n	36.5	35.8	35.9	37.3	35.9	35.0	35.5	35.8	35.9	35.9
	34.8	35.5	33.8	36.0	33.9	33.0	33.6	34.3	33.9	33.9
	21.1	33.6	28.9	33.9	29.4	21.4	25.2	33.8	29.1	29.4
		25.2	25.7	29.1	29.2		24.5	28.9	28.9	29.2
		24.4	24.8	28.9	29.1			25.8	25.8	28.9
				25.8	29.0			24.8	25.0	25.8
				24.9	25.8				24.9	24.9

1.2 酶源的影响

酶作为一种高效的生物催化剂, 广泛地应用于生物、有机合成等领域. 在有机合成中, 底物和介质对酶的活性及对产率都具有显著的影响^[23,24]. 本文选用不同的酶, 以异丙胺为底物, 脂肪胺与曲克芦丁乙酯的等物质的量的比为 10 : 1, 在吡啶中, 50 °C 下反应 24 h, 考察酶对曲克芦丁含氮类似物的催化合成. 酶源对反应产率的影响如表 2 所示.

从表 2 可以看出酶对曲克芦丁乙酯与异丙胺的反应都具有催化作用, 在空白试验中产率为 14.9%, 在酶催化下, 产率都是空白条件下的约 2 倍, 其中 lipase LS-10 对该反应的催化效果较为明显, 产率可达到 51.5%. 其他大部分酶催化作用下产率保持在 30%~

表 2 不同酶源对酰胺化反应的影响

Table 2 Effect of different origin of enzyme on the amidation

Enzyme	Yield/%
None	14.9
Novozym 435	36.1
Lipase AY30	24.6
Lipase LS-10	51.5
枯草杆菌蛋白酶	34.7
Amano Lipase M	34.3
Lipozyme LA 35025	35.4
Lipase AY "Amano" 50G	38.5
猪胰脂肪酶	33.7
米曲霉蛋白酶	37.2

40%之间, lipase AY30 的产率较低(24.6%). 所以对该反应催化效果较好的是 lipase LS-50, 在其它优化条件下

均采用 lipase LS-50 作为催化剂进行反应。

1.3 酶量和反应时间的影响

考察了不同浓度 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL 酶量对反应的影响。如图 1 所示, 反应产率随着反应体系中酶量的增加而增大。当酶量增大到 20 mg/mL 时, 初始反应速率明显增大, 产率也基本达到较大值, 在 Tongboriboon 等^[25]的研究中, 也报道了在一定的范围内, 增加酶量能够提高产率和初始反应速率。当酶量进一步增加时, 将引起体系粘度的增加, 导致初始反应速率降低^[26], 另外酶量大量增加时, 酶的活性位点不能暴露出来与反应底物结合, 以及大量的酶分子聚集在一起而影响催化效果^[27]。反应时间也影响产率, 从图 1 中看出, 反应产率随着时间增加而增加, 当反应 21 h 后, 产率基本达到平衡, 不再随时间发生明显的变化。综上所述, 酶量 ≥ 20 mg/mL 为最佳酶加入量。

图 1 酶量及反应时间对酰胺化的影响

Figure 1 Effect of enzyme concentration and time on the amidation

1.4 溶剂含水量对反应的影响

在有机相的酶催化反应中, 含水量是一个重要的影响因素^[28]。含水量对反应的影响如图 2 所示。

从图 2 可以看出反应体系中的含水量对 lipase LS-50 催化曲克芦丁乙酯和异丙胺的反应影响较大。随溶剂中含水量的增加, 酶的活性降低, 产率也随之下降。在含水量低于 1% 时, 反应产率及酶的活性最强, 产率在 50% 左右。当含水量 $\geq 4\%$ 时, 基本上无产物生成。过多的水存在导致酶活性降低, Ardhaoui 等^[29]研究了固定化的假丝酵母脂肪酶在有机溶剂中的反应活性, 在含水量低于 200×10^{-6} 时酶的活性最强, 反应产率达到最高。Kontogianni 等^[30]报道了芦丁与柚皮苷的酯化反应, 发现在含水量较低的情况下, 酶的活性最强。本反应体系最佳的溶剂含水量是小于 1%, 以保证酶的高活性。

图 2 含水量对反应的影响

Figure 2 Effect of the water content on the reaction

1.5 不同反应介质对反应的影响

酶的稳定性和活性与反应介质之间有密切的关系, 有机溶剂对酶活性的影响不仅能改变酶的活性, 还可能使酶变性。研究常以有机溶剂的极性、介电常数、溶解性、疏水常数等参数考察对酶活性的影响。我们初步选用了不同疏水常数的有机溶剂对反应进行了筛选, 结果发现, 在较大疏水常数的溶剂(正己烷、环己烷、二甲苯、甲苯、辛醇)中, 反应没有发生。当在能溶解曲克芦丁乙酯的溶剂(吡啶, DMF, DMSO)中, 有新产物出现。因此, 本文考察了吡啶, DMF, DMSO 及其双组分溶剂对反应的影响, 如表 3 所示。

表 3 不同反应介质对反应的影响

Table 3 Effect of solvents on the amidation catalyzed by lipase LS-10

Solvent	Yield/%
Pyridine	56.5
DMF	32.4
DMSO	34.6
Pyridine/DMF ($V:V=1:1$)	45.4
Pyridine/DMSO ($V:V=1:1$)	42.3
DMF/DMSO ($V:V=1:1$)	18.1

以吡啶为反应溶剂时产率最高, 达到了 56%。当吡啶中加入 DMF, DMSO 时, 产率明显较低。当以 DMF/DMSO 为溶剂时, 产率最低。

1.6 底物物质的量的比对反应的影响

酰胺化反应也受底物浓度的影响, 本文考察了异丙胺与曲克芦丁乙酯不同等物质的量的比(2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1)对反应的影响, 如图 3 所示。

从图 3 可以看出, 随着底物等物质的量的比从 2:1 增加至 7:1 时, 目标化合物的产率从 17% 升至 52%。在一定范围内, 随着异丙胺等物质的量的增加, 反应速率加快, 产率随着增加。可能的原因是异丙胺的增加导致

图3 底物等物质的量的比对酰胺化的影响

Figure 3 Effect of molar ratio of substrates on the amidation

动力学平衡的移动致使产物增加^[31]. 当异丙胺与曲克芦丁乙烯酯的等物质的量的比达到 5 : 1 时, 产率达到最大值, 此时再增加异丙胺则不能明显提高产率. 因此, 最佳的底物等物质的量的比应为 5 : 1.

2 结论

本文以 5 种具有不同链长的曲克芦丁乙烯酯作为底物, 在 lipase LS-10 催化下, 与脂肪胺反应, 合成了 10 个曲克芦丁含氮类似物; 同时考察了不同酶源、反应溶剂对反应产率、选择性的影响. 在反应温度 50 °C 下, 吡啶做溶剂并且含水量 < 1%, 异丙胺与曲克芦丁乙烯酯的等物质的量的比为 5 : 1, lipase LS-10 用量 20 mg/mL, 反应 21 h 时, 产率最高. 合成的曲克芦丁含氮类似物将进一步进行相关活性研究.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

仪器: CHA-S 气浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司); 真空泵(河南巩义市豫华仪器厂); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Bruker Avance 400 MHz 核磁共振波谱仪(DMSO-*d*₆ 作溶剂, TMS 作内标); BS224S 赛多利斯电子天平; Waters 高效液相色谱仪; Flash EA 1112 元素分析仪; Esquire 6000 LC-MS (Bruker).

试剂: 曲克芦丁乙烯酯(纯度 > 98%, 实验室合成); 枯草杆菌碱性蛋白酶, 无锡酶制剂厂; lipase AY30, 百灵威化学技术有限公司; 米曲霉蛋白酶和猪胰脂肪酶, Fluka 公司; lipase LS-10, 北京凯特新世界生物有限公司; Novozym 435, Amano Lipase M 和 lipozyme LA 35025, Sigma 公司; lipase AY “Amano” 50G, Amano 酶公司; 其他试剂均为分析纯.

3.2 实验方法

曲克芦丁乙烯酯(1.1 mmol)、正丙胺/异丙胺(5.5 mmol)和 lipase LS-10 (200 mg)加入到 150 mL 锥形瓶中. 以吡啶(10 mL)为溶剂, 在 150 r/min 转速、50 °C 条件下反应 24 h. 反应结束后过滤除去 lipase LS-10, 减压蒸除吡啶. 硅胶柱层析分离得到酶催化 *N*-丙基曲克芦丁酰胺类似物 **22af**~**2ef** 和 **2ag**~**2eg**, 洗脱剂为乙酸乙酯/甲醇/水(*V* : *V* : *V* = 15 : 3.6 : 1).

化合物 **2af**: 黄色粉末, 产率 45%, *R*_f = 0.19. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.84 (s, 1H, H₂), 7.75~7.77 (m, 1H, H₆), 7.67 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, NH), 7.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₅), 6.72 (s, 1H, H₈), 6.37 (s, 1H, H₆), 5.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{1'}), 4.38~4.40 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.29~4.31 (m, 1H, H_{1''}), 4.23~4.26 (m, 1H, H of B acylated), 4.10~4.11 (m, 4H, H of A), 3.74~3.75 (m, 4H, H of B), 3.71~3.74 (m, 1H, NHCH), 3.05~3.25 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.34~2.35 (m, 2H, H of CH₂COO-troloxerutin), 2.06~2.09 (m, 2H, H of CH₂CO-isopropylamine), 1.73~1.75 (m, 2H, other CH₂ of glutaridiodyl part), 1.01~1.03 (m, 6H, CH₃ of isopropylamine), 0.95 (d, *J* = 10.0 Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl); IR (KBr) ν: 3283 (OH), 1738 (O=C—O), 1653 (O=C—N); ESI-MS *m/z*: 920.5 (M + Na)⁺. Anal. calcd for C₄₁H₅₅NO₂₁: C 54.85, H 6.17; found C 54.78, H 6.18.

化合物 **2bf**: 黄色粉末, 产率 53%, *R*_f = 0.33. ¹H NMR (DMSO-*d*₆+D₂O) δ: 7.82 (s, 1H, H₂), 7.70 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₆), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅), 6.68 (s, 1H, H₈), 6.36 (s, 1H, H₆), 5.36 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H_{1'}), 4.35~4.37 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.27~4.29 (m, 1H, H_{1''}), 4.22~4.24 (m, 1H, H of B acylated), 4.03~4.08 (m, 4H, H of A), 3.73~3.78 (m, 4H, H of B), 3.17~3.19 (m, 1H, NHCH), 3.05~3.36 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.31 (s, 2H, H of CH₂COO-troloxerutin), 2.00~2.01 (m, 2H, H of CH₂CO-isopropylamine), 1.46~1.47 (m, 4H, other CH₂ of hexanediodyl part), 0.97~0.99 (m, 6H, CH₃ of isopropylamine), 0.91 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl); IR (KBr) ν: 3311 (OH), 1738 (O=C—O), 1653 (O=C—N) cm⁻¹; ESI-MS *m/z*: 934.5 (M + Na)⁺. Anal. calcd for C₄₂H₅₇NO₂₁: C 55.32, H 6.30; found C 55.27, H 6.28.

化合物 **2cf**: 黄色粉末, 产率 55%, *R*_f = 0.40. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 7.84 (s, 1H, H₂), 7.71~7.78 (m, 1H, H₆), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₅), 6.74 (s, 1H, H₈), 6.38 (s, 1H, H₆), 5.38 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H_{1'}), 4.31~4.40 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B

acylated), 4.26~4.27 (m, 1H, $H_{1''}$), 4.10~4.12 (m, 1H, H of B acylated), 4.04~4.08 (m, 4H, H of A), 3.70~3.76 (m, 4H, H of B), 3.17~3.19 (m, 1H, NHCH), 3.05~3.25 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.32~2.36 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{COO-troloxerutin}$), 1.97~2.01 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{CO-isopropylamine}$), 1.02~1.53 (m, 10H, other CH_2 of nonoanedioyl part), 0.97~1.01 (m, 6H, CH_3 of isopropylamine), 0.95 (d, $J=5.6$ Hz, 3H, CH_3 of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3344 (OH), 1738 ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$), 1652 ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 976.5 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{63}\text{NO}_{21}$: C 56.66, H 6.66; found C 56.70, H 6.64.

化合物 **2df**: 黄色粉末, 产率 55%, $R_f=0.43$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.84 (s, 1H, H_2), 7.71~7.78 (m, 1H, H_6), 7.61 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, NH), 7.15 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H_5), 6.74 (s, 1H, H_8), 6.38 (s, 1H, H_6), 5.38 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, $H_{1''}$), 4.31~4.40 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.26~4.27 (m, 1H, $H_{1''}$), 4.12~4.13 (m, 1H, H of B acylated), 4.05~4.08 (m, 4H, H of A), 3.70~3.78 (m, 4H, H of B), 3.17~3.18 (m, 1H, NHCH), 3.03~3.25 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.33~2.35 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{COO-troloxerutin}$), 1.97~2.00 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{CO-isopropylamine}$), 1.22~1.51 (m, 12H, other CH_2 of decanedioyl part), 0.96~0.97 (m, 6H, CH_3 of isopropylamine), 0.95 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, CH_3 of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3317 (OH), 1738 ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$), 1658 ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 990.5 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{NO}_{21}$: C 57.08, H 6.77; found C 57.15, H 6.76.

化合物 **2ef**: 黄色粉末, 产率 58%, $R_f=0.45$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.84 (s, 1H, H_2), 7.72~7.79 (m, 1H, H_6), 7.69 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, NH), 7.15 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H_5), 6.74 (s, 1H, H_8), 6.38 (s, 1H, H_6), 5.38 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, $H_{1''}$), 4.31~4.39 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.36~4.38 (m, 1H, $H_{1''}$), 4.25~4.27 (m, 1H, H of B acylated), 4.11~4.12 (m, 4H, H of A), 3.70~3.75 (m, 4H, H of B), 3.17~3.19 (m, 1H, NHCH), 3.05~3.24 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.31~2.35 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{COO-troloxerutin}$), 1.97~2.01 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{CO-isopropylamine}$), 1.20~1.51 (m, 18H, other CH_2 of tridecanoyl part), 1.01~1.03 (m, 6H, CH_3 of isopropylamine), 0.97 (d, $J=5.6$ Hz, 3H, CH_3 of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3330 (OH), 1732 ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$), 1653 ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 1032.5 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{NO}_{21}$: C 58.26, H 7.08; found C 58.22, H 7.09.

化合物 **2ag**: 黄色粉末, 产率 45%, $R_f=0.36$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.84 (s, 1H, H_2), 7.76~7.78 (m, 1H, H_6), 7.71 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, NH), 7.16 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H_5), 6.75 (s, 1H, H_8), 6.38 (s, 1H, H_6), 5.44 (d, $J=6.8$ Hz, 1H, $H_{1''}$), 4.40~4.43 (m, 3H, 2 H of A acylated, 1H of B acylated), 4.32~4.33 (m, 1H, $H_{1''}$), 4.25~4.27 (m, 1H, H of B acylated), 4.12~4.13 (m, 4H, H of A), 3.71~3.75 (m, 4H, H of B), 3.06~3.25 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.97~2.99 (m, 2H, NHCH_2), 2.35~2.36 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{COO-troloxerutin}$), 2.09~2.13 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{CO}-n\text{-propylamine}$), 1.75~1.78 (m, 2H, other CH_2 of glutaridoyl part), 1.36~1.41 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 0.97 (d, $J=5.2$ Hz, 3H, CH_3 of rhamnosyl), 0.80~0.84 (m, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); IR (KBr) ν : 3317 (OH), 1732 ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$), 1658 ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 920.5 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{NO}_{21}$: C 54.85, H 6.17; found C 54.79, H 6.18.

化合物 **2bg**: 黄色粉末, 产率 50%, $R_f=0.3$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6+\text{D}_2\text{O}$) δ : 7.83 (s, 1H, H_2), 7.73~7.75 (m, 1H, H_6), 7.14 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, H_5), 6.72 (s, 1H, H_8), 6.37 (s, 1H, H_6), 5.41 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, $H_{1''}$), 4.38~4.40 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.29~4.31 (m, 1H, $H_{1''}$), 4.24~4.26 (m, 1H, H of B acylated), 4.05~4.10 (m, 4H, H of A), 3.74~3.78 (m, 4H, H of B), 3.04~3.43 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.96~3.00 (m, 2H, NHCH_2), 2.34 (s, 2H, H of $\text{CH}_2\text{COO-troloxerutin}$), 2.05~2.08 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{CO}-n\text{-propylamine}$), 1.45~1.50 (m, 4H, other CH_2 of hexanedioyl part), 1.37~1.40 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 0.94 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, CH_3 of rhamnosyl), 0.79~0.80 (m, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); IR (KBr) ν : 3323 (OH), 1738 ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$), 1658 ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$) cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 934.4 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{57}\text{NO}_{21}$: C 55.32, H 6.30; found C 55.29, H 6.31.

化合物 **2cg**: 黄色粉末, 产率 55%, $R_f=0.34$. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.84 (s, 1H, H_2), 7.76~7.78 (m, 1H, H_6), 7.71 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, NH), 7.15 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H_5), 6.74 (s, 1H, H_8), 6.38 (s, 1H, H_6), 5.43 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, $H_{1''}$), 4.39~4.41 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.30~4.31 (m, 1H, $H_{1''}$), 4.25~4.28 (m, 1H, H of B acylated), 4.06~4.12 (m, 4H, H of A), 3.71~3.75 (m, 4H, H of B), 3.06~3.25 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.97~2.98 (m, 2H, NHCH_2), 2.35 (s, 2H, H of $\text{CH}_2\text{COO-troloxerutin}$), 2.00~2.03 (m, 2H, H of $\text{CH}_2\text{CO}-n\text{-propylamine}$), 1.24~1.51 (m, 10H, other CH_2 of nonoanedioyl part), 1.40~1.46 (m, 2H, NHCH_2CH_2),

0.97 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl), 0.80~0.84 (m, 3H, NHCH₂CH₂CH₃); IR (KBr) ν : 3344 (OH), 1738 (O=C—O), 1653 (O=C—N) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 976.4 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₄₅H₆₃NO₂₁: C 56.66, H 6.66; found C 56.58, H 6.65.

化合物 **2dg**: 黄色粉末, 产率 55%, $R_f=0.37$. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7.84 (s, 1H, H₂), 7.76~7.78 (m, 1H, H₆), 7.71~7.73 (m, 1H, NH), 7.15 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H₅), 6.74 (s, 1H, H₈), 6.38 (s, 1H, H₆), 5.40 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H_{1''}), 4.40~4.43 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.30~4.32 (m, 1H, H_{1''}), 4.26~4.28 (m, 1H, H of B acylated), 4.06~4.12 (m, 4H, H of A), 3.70~3.75 (m, 4H, H of B), 3.06~3.25 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.97~2.98 (m, 2H, NHCH₂), 2.31~2.36 (m, 2H, H of CH₂COO-troloxerutin), 1.99~2.02 (m, 2H, H of CH₂CO-*n*-propylamine), 1.22~1.52 (m, 12H, other CH₂ of decanedioyl part), 1.37~1.39 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 0.97 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl), 0.81~0.84 (m, 3H, NHCH₂CH₂CH₃); IR (KBr) ν : 3323 (OH), 1738 (O=C—O), 1658 (O=C—N) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 990.4 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₄₆H₆₅NO₂₁: C 57.08, H 6.77; found C 56.99, H 6.79.

化合物 **2eg**: 黄色粉末, 产率 58%, $R_f=0.43$. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7.84 (s, 1H, H₂), 7.74~7.77 (m, 1H, H₆), 7.69 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, NH), 7.15 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H₅), 6.74 (s, 1H, H₈), 6.38 (s, 1H, H₆), 5.38 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, H_{1''}), 4.39~4.41 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.38 (m, 1H, H_{1''}), 4.25~4.27 (m, 1H, H of B acylated), 4.08~4.12 (m, 4H, H of A), 3.70~3.75 (m, 4H, H of B), 3.05~3.24 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.98~3.04 (m, 2H, NHCH₂), 2.30~2.34 (m, 2H, H of CH₂COO-troloxerutin), 1.98~2.03 (m, 2H, H of CH₂CO-*n*-propylamine), 1.23~1.51 (m, 18H, other CH₂ of tridecanoyl part), 1.45~1.47 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 0.97 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl), 0.81~0.83 (m, 3H, NHCH₂CH₂CH₃); IR (KBr) ν : 3303 (OH), 1732 (O=C—O), 1639 (O=C—N), 1439 (C—N) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 1032.6 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₄₉H₇₁NO₂₁: C 58.26, H 7.08; found C 58.19, H 7.10.

References

- [1] Chen, A. Y.; Chen, Y. C. *Food Chem.* **2013**, *138*, 2099.
- [2] Zeng, S.; Liu, W.; Nie, F. F.; Zhao, Q.; Rong, J. J.; Wang, J.; Tao, L.; Qi, Q.; Lu, N.; Li, Z. Y.; Guo, Q. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *385*, 551.
- [3] Suresh Babu, K.; Hari Babu, T.; Srinivas, P. V.; Hara Kishore, K.; Murthy, U. S. N.; Madhusudana Rao, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 221.
- [4] Li, H. Q.; Shi, L.; Li, Q. S.; Liu, P. G.; Luo, Y.; Zhao, J.; Zhu, H. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6264.
- [5] Shin, J. S.; Kim, K. S.; Kim, M. B.; Jeong, J. H.; Kim, B. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 869.
- [6] Biasutto, L.; Marotta, E.; De Marchi, U.; Zoratti, M.; Paradisi, C. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 241.
- [7] Sun, X.; Hu, C. Q.; Huang, X. D.; Dong, J. C. *Chin. J. Org. Chem.* **2003**, *23*, 81 (in Chinese). (孙逊, 胡昌奇, 黄晓东, 董纪昌, 有机化学, **2003**, *23*, 81.)
- [8] Babu, T. H.; Rao, V. R. S.; Tiwari, A. K.; Babu, K. S.; Srinivas, P. V.; Ali, A. Z.; Rao, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1659.
- [9] Liu, T.; Hu, Y. Z. *Chin. J. Org. Chem.* **2006**, *26*, 983 (in Chinese). (刘滔, 胡永洲, 有机化学, **2006**, *26*, 983.)
- [10] Zhang, S. X.; Ma, J. G.; Bao, Y. M.; Yang, P. W.; Zou, L.; Li, K. J.; Sun, X. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7127.
- [11] Xanthakis, E.; Theodosiou, E.; Magkouta, S.; Stamatis, H.; Loutrari, H.; Roussos, C.; Kolisis, F. *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1.
- [12] Ma, X.; Yan, R.; Yu, S. Q.; Lu, Y. Y.; Li, Z.; Lu, H. H. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10844.
- [13] Al-Maharik, N. I.; Kaltia, S. A.; Mutikainen, I.; Wähälä, K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2305.
- [14] Zheng, X.; Meng, W. D.; Qing, F. L. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8083.
- [15] Lambusta, D.; Nicolosi, G.; Patti, A.; Sanfilippo, C. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *22*, 271.
- [16] Roh, C.; Choi, K. Y.; Pandey, B. P.; Kim, B. G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *59*, 248.
- [17] Roh, C.; Seo, S. H.; Choi, K. Y.; Cha, M.; Pandey, B. P.; Kim, J. H.; Park, J. S.; Kim, D. H.; Chang, I. S.; Kim, B. G. *J. Biosci. Bioeng.* **2009**, *108*, 41.
- [18] Mellou, F.; Loutrari, H.; Stamatis, H.; Roussos, C.; Kolisis, F. N. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 2029.
- [19] Salem, J. H.; Humeau, C.; Chevalot, I.; Harscoat-Schiavo, C.; Vandereesse, R.; Blanchard, F.; Fick, M. *Process Biochem.* **2010**, *45*, 382.
- [20] Nakajima, N.; Ishihara, K.; Itoh, T.; Furuya, T.; Hamada, H. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87*, 105.
- [21] Ziaullah; Bhullar, K. S.; Warnakulasuriya, S. N.; Rupasinghe, H. P. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 684.
- [22] Xiao, Y. M.; Li, J. T.; Mao, P.; Zhao, Z.; Lin, X. F. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *30*, 551 (in Chinese). (肖咏梅, 栗俊田, 毛璞, 赵贞, 林贤福, 有机化学, **2010**, *30*, 551.)
- [23] Hernández-Rodríguez, B.; Córdova, J.; Bárzana, E. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *61*, 136.
- [24] Chebil, L.; Anthoni, J.; Humeau, C.; Gerardin, C.; Engasser, J. M.; Ghoul, M. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9496.
- [25] Tongboriboon, K.; Cheirsilp, B.; H-Kittikun, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 52.
- [26] He, W.; Jia, C. S.; Ma, Y. A.; Yang, Y. B.; Zhang, X. M.; Feng, B. A.; Yue, L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 60.
- [27] Horchani, H.; Gargouri, A.; Sayari, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *75*, 35.
- [28] Gayot, S.; Santarelli, X.; Coulon, D. *J. Biotechnol.* **2003**, *101*, 29.
- [29] Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Ognier, S.; Engasser, J. M.; Mous-sou, P.; Pauly, G.; Ghoul, M. *J. Biotechnol.* **2004**, *110*, 265.
- [30] Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 59.
- [31] Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kolisis, F. N.; Stamatis, H. *J. Biotechnol.* **2005**, *116*, 295.

(Qin, X.)